

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2005年10月6日 (06.10.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/093070 A1

(51)国際特許分類⁷: C12N 15/38, 15/869, A61K 39/255, 39/265, C12N 7/01 // (C12N 7/01, C12R 1:93)

(74)代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP2005/004585

(22)国際出願日: 2005年3月9日 (09.03.2005)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2004-095500 2004年3月29日 (29.03.2004) JP

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドブック」を参照。



A1

(54)Title: RECOMBINANT HERPESVIRUS AND UTILIZATION OF THE SAME

(54)発明の名称: 組み換えヘルペスウイルス及びその利用

(57)Abstract: A recombinant herpesvirus having a DNA encoding a polypeptide which comprises 429 amino acids in the amino terminal side of a protein encoded by infective pharyngeal bronchitis virus gB gene or a polypeptide derived therefrom by deletion, addition or substitution of one or more amino acids (excluding infective pharyngeal bronchitis virus).

(57)要約: 伝染性喉頭気管炎ウイルスのgB遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ末端側のアミノ酸429個からなるポリペプチド、又は、その1つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、又は置換されたポリペプチドをコードするDNAを有する組み換えヘルペスウイルス(但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く)。

WO 2005/093070 A1

明細書

組み換えヘルペスウイルス及びその利用

技術分野

本発明は、伝染性喉頭気管炎ウイルス(*Infectious Laryngotracheitis Virus*; 以下、ILTVといふことがある)のgB遺伝子をコードするDNAを有する組み換えヘルペスウイルスと、その利用に関し、詳しくは、組み換え体中で安定して存在できるILTVのgB遺伝子の部分配列を有する組み換えヘルペスウイルス、及び抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチンに関する。

背景技術

伝染性喉頭気管炎は、ILTVの感染により発症する。ILTVは、ニワトリ、キジ、クジャク、シチメンチョウ等の鳥類に感染する。ニワトリにおける発症の特徴としては、呼吸器症状、体温上昇、食欲減退等があらわれ、強い咳や痰の喀出が挙げられる。また、産卵鶏が発症すると、発症後4日程度から産卵率が低下し、正常な産卵に戻るまで約1ヶ月を要する。さらに、ILTVと他の病原体との混合感染による死亡率の上昇等も報告されており、伝染性喉頭気管炎は養鶏産業に多大な経済的損失を与えていた。

伝染性喉頭気管炎の予防には、従来より、弱毒化したワクチン株による乾燥生ワクチンや凍結生ワクチンが用いられている。しかし、その免疫効果は飼育環境、飼育密度、接種方法等により一様ではない。さらに、ワクチン接種により、呼吸器系に若干の症状を起こさせることや、用法・接種量を誤ると発病する危険性もある。また、ある地域ではワクチン株の病原性復帰による発症の報告もあり、

安全かつ有効なワクチンの開発が望まれていた。

最近は、この問題点を克服するために、組み換え技術を利用した組み換えウイルスベクターを有効成分とするワクチンが開発されている。ILTVに関しては、ウイルスベクターとしてファウルポックスウイルス(以下FPVという)を用いることが検討され、実際に米国では市販もされている(BIOMUNE社、製品名VECTORMUNE FP-LT(+AE))。

ILTVは、伝染性喉頭気管炎の原因ウイルスである。ILTVはヘルペス属ウイルスの一種で、ウイルスゲノムは約16万塩基対の二本鎖DNAからなる。チミジンキナーゼ遺伝子(Griffinら、J. Gen. Virol.、71、841、1990)、gp60遺伝子(Kongsuwanら、Virus Genes、7:297-303、1993)、カプシドp40遺伝子(Griffinら、Nucl. Acids Res.、18:366、1990)、糖タンパク質B(gB)遺伝子(Poulsenら、Virus Genes、5:335-347、1991; Griffinら、J. Gen. Virol.、72:393-398、1991; 米国特許第5,443,831号公報)、糖タンパク質C(gC)遺伝子(Kingsleyら、Virology、203:336-343、1994)、RR2遺伝子(Griffinら、J. of General Virol.、70:3085-3089、1989)、UL32遺伝子(国際公開W098/07866号公報)などが知られている。

これらILTVのgB遺伝子は、オープンリーディングフレーム全長が2613bp(873アミノ酸)であり、この全長遺伝子を挿入した組み換えFPVが、ワクチンとして効果を示すことは、米国特許第5,443,831号公報などに報告されている。

ところで、FPVなどのポックスウイルスは、宿主体内で急激に増殖して、抗原タンパク質を発現した後、宿主の免疫系によりほぼ完全に駆逐される。しかし、ウイルス駆逐後も、免疫がメモリーされたり、ブーストされる点で、ポックスウイルスはワクチン用の宿主として好適であるといわれている。一方、七面鳥ヘルペスウイルス(以下、HVTと言うことがある)などのヘルペスウイルスは、宿主

体内で急激に増殖はせず、潜伏感染状態が長期間続く。そしてこの潜伏期間中、ヘルペスウイルスは宿主免疫系を刺激し続けるという特徴がある。こうした特徴を生かした組み換えHVTのワクチンベクターとしての利用が検討されている。

特表平4-501658号公報(EP434721)では、ILTVの抗原遺伝子をHVTに組み込んだ組み換えHVTが構築し得る旨の記載はあるが、実際に組み換え体を得てはいない。

また、特開2001-000188号公報においては、ILTVのgB遺伝子全長とUL32遺伝子の2つの遺伝子を挿入した組み換えHVTを構築している。そして、免疫蛍光抗体法を用いてこの組み換えHVTがインビトロで挿入した遺伝子に対応するタンパク質を発現することを確認しているが、ワクチンとしての効果は確認されていない。

発明の開示

かかる従来技術のもと、本発明者らは、ILTVのgB遺伝子全長の上流にプロモータを連結したDNA分子をヘルペスウイルスゲノムに挿入した組み換えヘルペスウイルスについて、継代培養による純化を試みたが、ILTVのgB遺伝子の脱落が生じ、純化が不可能であることを確認した。gB遺伝子が脱落してしまうと、組み換えヘルペスウイルスが、抗ILTV用ワクチンとして機能しない。また、ILTVとHVTは、どちらもヘルペスウイルスであり、HVT自体にも必須遺伝子であるgB遺伝子が存在する。

そこで、本発明者らは、ウイルス粒子形成時に、gB遺伝子どうしが競合するおそれがあるため、ILTVのgB遺伝子産物の膜アンカ一部分及び細胞質ドメインを欠損させて、ILTVのgBタンパク質を膜タンパク質ではなく分泌タンパク質にすることにより、競合を回避しつつ抗原性を保持させることが重要と考えた。

この知見に基づき、本発明者らは継代培養にも安定な組み換えヘルペスウイルスを得るべく鋭意検討した結果、単に膜アンカー部分と細胞質ドメインとを欠損させるだけでなく、さらにgB遺伝子を所定の長さに切り縮めることにより、ワクチン効果が得られること、そして、この切り縮めたgB遺伝子に特定の付加配列を連結させると、より高いワクチン効果が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

かくして本発明によれば、伝染性喉頭気管炎ウイルスのgB遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ末端側のアミノ酸429個からなるポリペプチド、又は、その1つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、又は置換されたポリペプチドをコードするDNAを有する組み換えヘルペスウイルス(但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く)が提供される。更に、当該組み換えヘルペスウイルスを有効成分とする抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチンが提供される。

図面の簡単な説明

図1は、FW050と元のホモロジーベクターとの比較を示す図である。

図2は、ホモロジーベクターの模式図である。

発明の実施するための最良の態様

以下に、本発明を詳述する。

(DNA)

本発明に用いるDNAは、ILTVのgB遺伝子によってコードされるタンパク質(以下、gBタンパク質という)の、アミノ末端側の429アミノ酸からなる部分ペプチドをコードするもの(以下、部分gB遺伝子ということがある)である。また、この部分ペプチドのアミノ酸配

列は、1つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、或いは置換されてもよい。

本発明に用いるDNAの具体例としては、配列番号2記載の429個のアミノ酸配列をコードするDNAが挙げられ、具体例としては配列番号3記載の塩基配列のDNAが挙げられる。

gB遺伝子の起源となるILTVとしては、例えば、NS-175株(家畜衛生菌株目録の菌株番号VA0204、社団法人動物用生物学的製剤協会)、CE株(幸田、麻布獸医科大学研究報告、31、133-202、1976)、SA-2株(Johnsonら、Arch. Virol.、119、181-198、1991)、強毒野外分離株632株(Keelerら、Avian Diseases、35、920-929、1991)、USDAチャレンジ株(Poulsenら、J. General. Virol.、78、2945-2951, 1997)が挙げられる。

gB遺伝子は限定されず、ILTV由来のgBタンパク質をコードするものであれば使用可能で、たとえば、強毒野外分離株632株由来のgB遺伝子(GeneBank ACC. No. X56093)、SA 2株由来のgB遺伝子(GeneBank ACC. No. M64927)などが挙げられる。

また、配列番号4記載のアミノ酸配列をコードするDNA(以下、付加DNAということがある)を、上述した部分gB遺伝子の3'末端側にインフレームで連結させることにより、ワクチン効果を向上させることができる。配列番号4記載のアミノ酸配列の1つ又は複数個のアミノ酸が欠失、付加、或いは置換されていてもよい。

付加DNAを部分gB遺伝子に、インフレームで連結することが、ワクチン効果を向上させる点で重要であり好ましい。

配列番号4記載のアミノ酸配列は、既知のなんらかの機能を有する配列、又は、なんらかの機能を有すると推定される配列をもっているものではない。配列番号4記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列120bp(終始コドン含まず)(配列番号5)のうち、87bpはSV40ボ

リアデニレーションシグナル由来、16bpはHVTのUL45由来、13bpは人工的に導入されたSfiI配列由来のものであり、4bpはフランキング配列である。

部分gB遺伝子と付加DNAとをインフレームで連結する方法に格別な制限はなく、遺伝子組み換えの教科書(Sambrook J、Russel D.W.編Molecular Cloning、Third Ed.、Cold Spring Harbor Laboratory Pressなど)に記載されている一般的な方法を用いることができる。一般的な方法とは、制限酵素切断面同士で連結する方法が挙げられる。制限酵素認識部位がない場合は、PCR(ポリメラーゼチーンリアクション)やインビトロ突然変異を用いることにより制限酵素認識部位を導入すればよい。

(組み換えヘルペスウイルス)

本発明の組み換えヘルペスウイルスは、親ウイルスとして、ILTV以外のヘルペスウイルスを用いるものでなければならない。親ウイルスであるヘルペスウイルスは、ほ乳類や鳥類に感染するいかなるヘルペスウイルスでもよい。しかし、組み込んだ遺伝子が安定してILTV内に存在できないため、ILTVを親ウイルスとして使用することはできない。鳥類用ワクチンを得る場合、親ウイルスであるヘルペスウイルスとして、マレックウイルスを選択するのが望ましい。マレックウイルスは、1、2及び3型の3種類があるが、本発明においてはどの型のものを選択しても良い。これらのマレックウイルスは、天然に得ることができるほか、ATCCなどから有償又は無償で入手できるものが挙げられ、特に非病原性のものが好ましい。このようなウイルスとしては、例えば、マレックウイルス1型であれば、CVI988(Rispens)株など、マレックウイルス2型であればSB-1株など、マレックウイルス3型(HVT)であれば、FC126(ATCC VR-584B)、PB-THV1、H-2、YT-7、及びHPRS-26などが例示できる。

組み換えヘルペスウイルスを構築する方法に格別な制限はなく、上述した部分gB遺伝子と必要に応じて連結された付加DNAとを有する組み換え用プラスミドを用い、相同組み換えによって、親ウイルスであるヘルペスウイルスに挿入すれば良い。もちろん、このとき部分gB遺伝子は、外来又は内因のプロモータの支配を受ける位置に配置する。

組み換え用プラスミド(以下、ホモロジーベクターという)として用いるプラスミドとしては、一般に用いられるものを用いることができ、例えば、pBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC8、pUC18、pUC19などが例示される。

ホモロジーベクターの構築は、ベクターの有する制限酵素サイトを利用して、常法に従って行えば良い。

ホモロジーベクターは、上述した部分gB遺伝子に、通常はプロモータとポリAシグナルを付加したものを、組み換えヘルペスウイルスの増殖に非必須な領域中に挿入したプラスミドである。

以下、本発明のホモロジーベクターの構築方法について、説明する。

組み換えヘルペスウイルスにDNAを組み込む場合、高い発現量を得るため、通常、制御遺伝子(プロモータ)の制御下に、本発明のDNA分子が配置されるように組み込む。プロモータは、真核細胞で機能する一般的なものでよく、真核細胞由来でもウイルス由来のものでも構わない。プロモータの具体的な例としては、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモータ(RossらJ. Gen. Virol.、74:371-377、1993)、七面鳥ヘルペスウイルス(HVT)及びマレックウイルス(MDV)1型のgBタンパク質プロモータ(Rossら、J. Gen. Virol.、74:371-377、1993)、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)のIEプロモータ(Stinskiら、J. Virol.、55:431-441、1985)、SV40プロモータ(Gunn

ingら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、84:4831-4835、1987)、ヒト β アクチンプロモータ(GunningらProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、84:4831-4835、1987)、ニワトリ β アクチンプロモータ(Kostら、Nucleic Acids Res.、11:8287-8301、1983)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)のLTRプロモータ(Greuelら、Virology 177:33-43、1990)、Pecプロモータ(特開2001-000188号公報)などが例示される。

プロモータに加えて、転写を活性化する因子であるエンハンサーを加えることにより、さらに効率的な発現が予想される(Stinskiら、J. Virol.、55:431-441、1985)。エンハンサーは、サイトメガロウイルス由来プロモータの一部などが例示され、挿入遺伝子との位置的関係は通常限定されない。このタイプのプロモータとして、特開2001-000188号公報において示されているPecプロモータなどが例示される。

このほか、更に、付加DNAの下流に、ポリアデニレーションシグナルを付加すると、特に高い発現量が得られることが期待される。

ポリアデニレーションシグナルとしては、SV40などのPolyAシグナル(Gunningら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、84:4831-4835、1987)やマレックウイルス(MDV)1型のUL46h、UL47h、UL49hのPolyAシグナル(YanagidaらJ. Gen. Virol.、74:1837-1845、1993)が例示される。

ヘルペスウイルスの増殖に非必須な遺伝子領域は、例えばマレックウイルス(MDV)1型、2型、及び3型(3型は七面鳥ヘルペスウイルスである)を例にとると、TK領域(Rossら、16th International Herpes Workshop、1991)、US10領域(SakaguchiらVaccine、12:953-957、1994)、US2領域(Sondermeijer. P. J. ら、Vaccine、11:349-358、1993)、及び特開平11-192093に記載のUL44と45の間の領域やUL45と46の間の領域などを例示することができる。

本発明のDNAの一例である部分gB遺伝子や付加DNAなどの外来遺伝子を、この非必須領域中に挿入して、ホモロジーベクターを構築する。本発明のDNAなどの外来遺伝子を挿入するための非必須領域の長さは特に限定されないが、外来遺伝子挿入部位の前後に10bp以上、好ましくは100bp以上、より好ましくは500bp以上の非必須領域由来の塩基があればよい。

上述のホモロジーベクターと親ウイルスとなるヘルペスウイルスとの間に相同組み換えを起こさせて、組み換えヘルペスウイルスを得る。

組み換えヘルペスウイルスを作製する具体的な方法としては、以下に説明する方法が挙げられる。

ホモロジーベクターをヘルペスウイルス感染細胞に、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクチンを用いた方法、遺伝子銃を用いた方法などで導入する。たとえば親ウイルスが鳥類ヘルペスウイルスの場合、ヘルペスウイルスを感染させる細胞は、鳥類由来の細胞が望ましく、たとえばCEF(ニワトリ胚纖維芽細胞)、発育鶏卵、鶏腎臓細胞などが挙げられる。感染細胞の培養は、通常行われる培養法でよい。ホモロジーベクターを感染細胞に導入する方法は、高い導入効率が得られる点から、エレクトロポレーションやリポフェクチンを用いた方法を採用することが望ましい。導入するホモロジーベクター(プラスミド等)の量を0.1~1000 μgの範囲とすると、ヘルペスウイルスのゲノムDNAとホモロジーベクターの相同領域との間での組み換えヘルペスウイルスの発生率が高くなる。このようなホモロジーベクターを導入した組み換えヘルペスウイルスのみを選択して得る方法としては、BPA(Black Plaque Assay)法を用いることができる。BPA法とは、外来遺伝子に対する抗体を用いて、免疫反応を行い、外来抗原を発現したplaquesを可視化

する方法で、外来遺伝子に対する抗体を用い、次に酵素標識をした二次抗体を用いて、最後に対応する基質を用いて可視化する。この方法により、外来遺伝子を発現した組み換えヘルペスウイルスを選択する。また、これら組み換えヘルペスウイルスを作製する場合、外来遺伝子として β -ガラクトシダーゼなどのマーカー遺伝子を組み込む検出が容易であるという利点がある。 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を用いた場合、Bluo-Gal(インビトロジエン社製)などを用いて、簡単に発現をモニターしながら組み換え体を単離することができる。それ以外ではプラークハイブリダイゼーションなどの方法により目的とする組み換えヘルペスウイルスを単離する。これら操作を繰り返すことによって、組み換えヘルペスウイルスを純化する。

(抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチン)

本発明の抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチンは、上述した本発明の組み換えヘルペスウイルスを有効成分とする鳥類用のワクチンである。

ワクチンの調製方法に格別な制限はなく、例えば以下の方法により調製することができる。

本発明の組み換えヘルペスウイルスの感染細胞を当該ウイルスが生育できる細胞(以下、宿主細胞という)に感染させ、増殖させた後、細胞をスクレーパー又はトリプシンではがし、遠心分離によって感染細胞と上清とに分離する。たとえば親ウイルスが鳥類ヘルペスウイルスの場合、宿主細胞としては、鳥類由来の細胞が好ましく、CEF(ニワトリ胚纖維芽細胞)、鶏腎臓細胞などを好適に使用することができる。得られた感染細胞は、10%のジメチルスルフォキシド(DMSO)を含む培養用培地に懸濁し、液体窒素下で凍結保存する。ワクチンとして使用する時は、適量のリン酸緩衝液や生理食塩水などにこの凍結保存品を溶かして使用する。

液体窒素下で上記感染細胞を保存するための安定剤やその他の成分は、ウイルス感染細胞が安定的に生存でき、かつレシピエントにとって薬理学的に問題のない成分であれば特に限定されない。

このようにして作製した組み換えヘルペスウイルスを主成分とするワクチンの鳥への投与方法は特に限定されない。例えば、鳥個体の皮下に注射する方法や、発育卵に穴をあけて接種する方法など、現行のヘルペスウイルスワクチンと同じ方法が挙げられる。

接種量や接種時期も現行のワクチンと同様でよい。例えば、孵化当日の鳥の背部皮下に $10^2 \sim 10^5$ PFU又は $10^2 \sim 10^4$ TCID₅₀ のドーズを20G以上の針を用いて接種することにより、ワクチンとしての効果が期待される。また発生後18～19日目の発育卵に穴をあけて上記と同様のドーズを接種してもよい。接種方法は、鳥に対して針で接種する方法以外に、Inovoject(Embrex社)などのin ovo接種装置を用いて接種する方法が挙げられる。

上記のようにして得られた組み換えヘルペスウイルスは、ILTVに対するワクチンとしてばかりでなく、親ウイルスとなったヘルペスウイルスに対するワクチンとしても機能する。

実施例

実施例1. ILTVgB遺伝子全長をもつ組み換え用プラスミド(ホモロジーベクター)の構築

米国公開2003-0059799号公報記載のpGHMCSpolyASfiのBgII切断125bp断片を国際公開99/18215号公報(EP1026246)記載のpNZ45/46SfiのSfiII断片に挿入して、p45/46HMCSpolyASfiを構築した。国際公開99/18215号公報(EP1026246)記載のpUC18Xlacをテンプレートとして、配列番号6のプライマーM13(-21)と配列番号7のプライマーlac3'KpnRでPCRを行い、3205bpの断片を得た。

尚、PCRは、Pfu Polymerase (Stratagene社)と、PerkinElmer社のDNA Thermal Cycler480を用いて、通常の条件(変性反応を95°C 1分、アニール温度を60°C又は55°C 2分、伸長反応を72°C 3分)で30サイクル行った。また、全実施例において特に断りがないかぎりこの条件で行った。

このPCRで増幅した3205bpの断片をBamHIとKpnIとで切斷して得られた3149bp断片と、p45/46HMCSpolyASfiをBamHIとKpnIとで切斷して得られた5573bp断片とをライゲーションしてpNZ45/46HlacpolyASfiを構築した。

一方、pBK-CMV(Stratagene社)をテンプレートとして、配列番号6のプライマーM13(-21)と配列番号8のプライマーpCMV-1とを用いてPCRを行い、953bpの断片を得て、これをPstIとNheIとで切斷して得られた599bp断片と、pNZ45/46HlacpolyASfiをPstIとSphIとで切斷して得られた382bp断片と、pNZ45/46HlacpolyASfiをSphIとXbaIとで切斷して得られた8332bp断片とを3断片ライゲーションしてpNZ45/46HCMVlacを構築した。

ILTVgB遺伝子内のBg1I切斷部位を、コードするアミノ酸を変えさせることなく、欠失させる目的で、特開平10-807866号公報(EP953642)記載のpGTPs/ILgBをテンプレートにして、配列番号9記載のプライマーILgB-5と配列番号10記載のプライマーILgB-Bg1RとでPCR増幅をして得られた1132bp断片と、配列番号11記載のプライマーILgB-Bg1と配列番号12記載のプライマーILgB-3+KpnとでPCR増幅をして得られた1564bp断片の2断片を得た。この2断片をテンプレートとして、配列番号9記載のプライマーILgB-5と配列番号12記載のプライマーILgB-3+KpnとでPCRを行い、2648bp断片を得た。この2648bp断片をBamHIとKpnIとで切斷して得られた2638bp断片を、特開2001-000188号公報記載のpGIPecをBamHIとKpnIとで切斷して得られた3280bp

断片とライゲーションしてpGIPecILgBを構築した。

このpGIPecILgBをBamHIとKpnIとで切斷した2638bpの断片と、ヨーロッパ特許第1298139号公報に記載のpGIBacpAをBamHIとKpnIとで切斷して得られた4479bp断片とをライゲーションして、pGIBAcgBpAを構築した。

このpGIBAcgBpAをBglIで切斷して得られた4464bp断片を、前述のpNZ45/46HCMVlacのSfiI部位に挿入することによって、プロモータとしてCMV-IEを有するホモロジーベクターp45/46HCMVlacBacgB2ndを構築した。

次にCMVプロモータ内のBglI切斷部位を欠失させる目的で、特開2001-000188号公報記載のpGIPecをテンプレートとして、配列番号8記載のプライマーpCMV-1と配列番号13記載のプライマーpPec1RとでPCR増幅をした293bpの断片を得た。pBK-CMV(Stratagene社)をテンプレートとして配列番号14のプライマーpCMV-o1と配列番号15のプライマーpCMV-R1とでPCR増幅をした341bp断片を得た。これら2断片をテンプレートとして、配列番号8記載のプライマーpCMV-1と配列番号15記載のプライマーpCMV-R1とでPCR増幅をし、604bp断片を得た。この604bp断片をPstIとXbaIとで切斷して得られた589bp断片と、特開2001-000188号公報記載のpGIPecをPstIとXbaIとで切斷して得られた2765bp断片とをライゲーションしてpGICMV(-)を構築した。

このpGICMV(-)をBamHIとXhoIとで切斷して得られた2137bp断片と、前述のpGIBAcgBpAをBamHIとXhoIとで切斷して得られた4054bp断片をライゲーションし、pCMV-ILgBを構築した。このpCMV-ILgBをBglIで切斷して得られた3338bp断片を、pNZ45/46RSVlac-TのSfiI部位に挿入することによって、プロモータとしてCMV-IEを有するホモロジーベクターp45/46CMVILgBlacを構築した。

特開2001-000188号公報記載のpGIPecをBamHIとXhoIとで切斷して得られた2103bp断片と、前述のpGIBAcgBpAをBamHIとXhoIとで切斷して得られた4054bp断片とをライゲーションしてpGIPecILgB2を構築した。

このpGIPecILgB2をBg1Iで切斷して得られた3504bp断片を、特開平11-192093号公報(EP1026246)記載のpNZ45/46RSVlac-TのSfi I部位に挿入することによって、プロモータとしてPecプロモータを有するホモジーベクターp45/46PecILgBlacを構築した。

同様に、前述のpGIPecILgB2をBg1Iで切斷して得られた3504bp断片を、特開平11-192093号公報(EP1026246)記載のpNZ45/46SfiのSfi I部位に挿入することによって、プロモータとしてPecプロモータを有するホモジーベクターp45/46PecILgBを構築した。

実施例2. ILTVgB遺伝子全長をもつ組み換えHVTの構築と純化

実施例1で構築した4つのホモジーベクター(p45/46HCMVlacBacg B2nd、p45/46CMVILgBlac、p45/46PecILgBlac、p45/46PecILgB)を用いて組み換えHVTを構築し、その純化を行った。

具体的には以下の通りに行った。

まず、Morganら(Avian Dis.、Vol. 34、345-351、1990)の方法に従って、HVTのDNAを回収した。つまり、約 1×10^5 PFUのHVT、FC126株(ATCC VR-584B)又は、FC126株(Witter博士より分与されたオリジナル株)を約 3×10^7 個のCEFに感染させ、2~3日培養した後、lysis Buffer(0.5%SDS、10mM Tris(pH8.0)、100mM NaCl、1mM EDTA、200 μg/ml ProteinaseK)を4ml加えて、37°Cで4時間インキュベートした後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行って、HVT-DNAを回収した。

ホモジーベクターは、制限酵素を用いて、相同部位や外来遺伝子を含まない部分で、切斷し、直鎖状にした。

トリプシンを用いて回収した、約 3×10^6 個のCEFをSaline G(0.14 M NaCl、0.2mM KC1、1.1mMリン酸水素二ナトリウム、1.5mMリン酸水素一カリウム、0.5mM塩化マグネシウム・6水和物、0.011%グルコース)に懸濁し、先述のHVT-DNA 10~30 μg と、直鎖状にした組み換え用ホモロジーベクター10~30 μg をそれぞれ室温においてジーンパルサー(Bio-Rad社製)を用いて、0.5KVcm⁻¹、0.4msecの条件下でエレクトロポレーションした。この細胞懸濁液を直径6cmの培養皿に播き、生育培地を加えて、5~7日間培養した。培養後、培養液から組み換えHVTを含むウイルスを回収した。次いで、限界希釈法により、組み換えHVTの純化を行った。

純化の具体的な方法は以下の通りであった。

lacZ遺伝子を含まないホモロジーベクターp45/46PecILgBについては、約 2×10^6 個のCEFと共に段階希釈したウイルス液と共に、96well plateに播いた。3~5日培養して、plaquesが出現後、レプリカを作製した。このうちの1つのプレートに対して、次の通りBPA(B lack Plaque Assay)法によりスクリーニングを行った。

ILTV-gBタンパク質を大腸菌で発現させたタンパク質をウサギに免疫して得た抗血清(抗ILTV-gB抗血清)を通常細胞培養に用いられるマグネシウムを含まないダルベッコ(Dulbecco's)リン酸バッファー(大日本製薬社製;以下、PBS(-)という)で約500倍に希釈したものを、22~25°Cで2時間、plaquesと反応させた。3%Non-fat dried milk in PBS(-)で3度洗浄した後、ビオチン化抗ウサギ抗体(ヒツジ、Biosource社)で22~25°C、2時間、plaquesと反応させた。反応後の抗体をPBS(-)で洗浄した後、アビジン-ビオチン-アルカリフオースフォターゼComplex(Vector laboratories)で反応させた。未反応のアビジン-ビオチン-アルカリフオースフォターゼComplexをPBS(-)でリーンスすることによって洗い流した後、アルカリフオースフォター

ゼの基質であるBCIP/NBT(ロシュ社製)を用いて、濃紺から黒色に呈色させた。

BPA法は、こうして発生した陽性のplaquesに対応する懸濁ウイルス液を再度、CEFに感染させることによって、さらに同様の操作を3~4回繰り返して全てのplaquesがBPAにより陽性となるまで行い、通常は、組み換えHVTの純化構築を完了するものである。

しかし、p45/46PecILgBを組み込んだ組み換えHVTについては、100%純化された組み換えHVTを得ることはできなかった。

lacZを含むホモロジーベクターp45/46HCMVlacBacgB2nd、p45/46CMVILgBlac、及びp45/46PecILgBlacを用いた組み換えHVT構築は、以下の手順によって行った。

即ち、約 2×10^6 個のCEFと共に段階希釈したウイルス液と共に、培養用平底96ウェルマルチプレートに播いた。3~5日培養して、plaquesが出現後、レプリカを作製した。このうちの1つのプレートに対して、 β -ガラクトシダーゼの発色基質であるブルオガル(Blue-gal:GIBCO社製)を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を $100 \mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加え、37°Cにおいて約4時間インキュベートした。lacZを発現するplaquesは青変するので、青変plaquesを含むウェルに対応するもう一つのプレートのウェルより細胞を回収することによりウイルス液とした。このウイルス液を上記と同様に約 2×10^6 個のCEFと共に培養用平底96ウェルマルチプレート播いた。培養用平底96ウェルマルチプレートから培養用平底96ウェルマルチプレートに一回継代する行程を一回のスクリーニングとした。スクリーニングを全ウェルが青plaquesになるまで繰り返し、ブルオガルを加えたときに全plaquesが青変するまで(通常、だいたい5~10回のスクリーニング)純化を行った。

その結果、ホモロジーベクターp45/46PecILgBlacからのみ、1クローンの組み換えHVTの純化に成功し、これをFW050と名づけた。

p45/46HCMVlacBacgB2ndとp45/46CMVILgBlacを用いた場合については、100%純化された組み換えHVTが得られなかった。

実施例3. 組み換えHVT FW050の構造とワクチン効果

実施例2で得られた組み換えHVTであるFW050のダイレクトシークエンスを行った。その結果、FW050は、PolyAシグナルを含む1542bpが欠失していて、その代わりに由来不明の3塩基(GCG)が挟まれていることが判明した(配列番号22)。その結果、ILTVgB遺伝子本来のORFのアミノ末端側にある429個のアミノ酸と、終止コドンができるまでPolyAシグナル部分がコードすることになった40個のアミノ酸とかなる469個のアミノ酸で構成されたキメラタンパク質を発現するであろうことが予測された(図1及び配列番号1参照)。

このFW050について、ワクチン効果を調べる動物実験を行ったところ、表1のような結果となった。

動物実験は、米国農務省Animal and Plant Health Inspection Service(APHIS)が定めた規定(9 CFR)に準じて行った。

強毒ILTVチャレンジについては、9 CFR Ch. 1 113.328に記載されている方法を用いて行った。つまり、各群10羽以上の試験用SPF鶏(LineM:日本生物科学研究所)に、組み換えHVTを接種した(実験1でのみ、FW050については接種後、事故死のために、接種鶏数は9となっている)。陰性対照群(コントロール)は非接種とした。

試験用SPF鶏が孵化したとき、組み換えHVT FW050を鶏の背部皮下に 1×10^4 PFUとなるように26Gの注射針を使って接種した。4週齢で、強毒ILTV、NS-175株 $1 \times 10^{3.0}$ EID₅₀/0.1mlを眼窩下洞に接種して攻撃した。接種後10日間、毎日臨床症状を観察して、感染防御したか否かを判断した。

結果を表1に示す。

表1から判るとおり、FW050については、ILTV強毒株に対する防御

効果が認められた。

(表 1)

| | 組み換え HVT | ホモロジーベクター | 防御率 % (防御羽数 / 全羽数) | |
|--------|-------------|------------------|--------------------|-----------|
| | | | 実験1 | 実験2 |
| コントロール | | | 0 (0/10) | 0 (0/16) |
| チャレンジ | FW050 | p45/46PecILgBlac | 78 (7/9) | 31 (4/13) |

実施例4. ILTVのgB遺伝子を切り縮めた断片をもつ組み換え体の構築

ILTVのgB遺伝子0RFを一部欠失させた変異体gB遺伝子産物をもつホモロジーベクターを以下の通り構築した。

(1) ILTVのgB遺伝子0RFでダイマー形成領域を含まないであろうアミノ末端から623アミノ酸gB-aをコードするDNAを含むホモロジーベクター:p45/46PecILgBaおよびp45/46PecILgBalac

実施例1で構築したpGIPecILgB2をテンプレートとして用いて、配列番号16記載のプライマーP-BglIIと配列番号17記載のプライマーA-Rとを用いて、前述の常法でPCRを行い、1205bpの断片を増幅した。これをBglIIとKpnIとで切断して得られた1198bp断片と、実施例1で構築したp45/46PecILgBをBglIIとKpnIとで切断して得られた7057bp断片とをライゲーションすることにより、ホモロジーベクターp45/46PecILgBaを構築した。

p45/46PecILgBaをBglIIとXhoIとで切断して得られた6373bp断片と、実施例1で構築したp45/46PecILgBlacをBglIIとXhoIとで切断して得られた5923bp断片とをライゲーションして、ホモロジーベクターp45/46PecILgBalacを構築した。

(2)膜貫通領域の直前まで、カルボキシ末端を欠失させた691アミノ酸gB-bをコードするDNAを含むホモロジーベクター:p45/46PecILgBbおよびp45/46PecILgBblac

実施例1で構築したpGIPecILgB2をテンプレートとして用いて、配

列番号16記載のプライマーP-Bg1IIと配列番号18記載のプライマーB-Rを用いて、前述の常法でPCRを行い、1409bpの断片を増幅した。これをBg1IIとKpnIとで切斷して得られた1402bp断片と、実施例1で構築したp45/46PecILgBをBg1IIとKpnIとで切斷して得られた7057bp断片とをライゲーションすることにより、ホモロジーベクターp45/46PecILgBbを構築した。

p45/46PecILgBbをBg1IIとXhoIとで切斷して得られた6577bp断片と、実施例1で構築したp45/46PecILgBlacをBg1IIとXhoIとで切斷して得られた5923bp断片とをライゲーションして、ホモロジーベクターp45/46PecILgBblacを構築した。

(3)膜貫通領域のみを欠失させた803アミノ酸gB-cをコードするDNAを含むホモロジーベクター:p45/46PecILgBcおよびp45/46PecILgBc1ac

実施例1で構築したpGIPecILgB2をテンプレートとして用いて、配列番号16記載のプライマーP-Bg1IIと配列番号19記載のプライマーC-Rを用いて、前述の常法でPCRを行い、1409bpの断片を増幅した。また、同様にpGIPecILgB2をテンプレートとして、配列番号20記載のプライマーC-Fと配列番号21記載のプライマーCDE-Rを用いて、常法でPCRを行い、357bpの断片を増幅した。1409bpと357bpの2つの断片をテンプレートとして、配列番号16記載のプライマーP-Bg1IIと配列番号21記載のプライマーCDE-Rを用いて、常法でPCRを行い、1745bpの断片を増幅した。これをBg1IIとKpnIとで切斷して得られた1738bp断片と、実施例1で構築したp45/46PecILgBをBg1IIとKpnIとで切斷して得られた7057bp断片とをライゲーションすることにより、ホモロジーベクターp45/46PecILgBcを構築した。

p45/46PecILgBcをBg1IIとXhoIとで切斷して得られた6913bp断片と、実施例1で構築したp45/46PecILgBlacをBg1IIとXhoIとで切斷し

て得られた5923bp断片とをライゲーションして、ホモロジーベクターp45/46PecILgBclacを構築した。

これらホモロジーベクターの模式図を図2に示す。

以上に述べたように構築した6つのホモロジーベクターを用いて、実施例2と同様に組み換えHVTの純化を行ったが、ホモロジーベクターと同じ構造の組み換え体を得られなかった。

以上のように、プロモータに続けて、gBタンパク質のカルボキシ末端から切り縮めた複数のホモロジーベクターを構築し、組み換えHVTの純化構築を試みたが、ホモロジーベクターと同じILTVgB遺伝子の長さをもつ組み換えHVTは得られなかった。この結果より、プロモータと共に組みこんだgB遺伝子を組み換えHVTで発現させようとした場合、長いORFのものは純化が不可能であることが判った。また、仮に組み換えHVTを純化することができたとしても選択圧により、得られる組み換えHVT中のgB遺伝子のORFが短くなってしまうことが考えられた。即ちプロモータと共にgB遺伝子を組み込んだ場合、安定な組み換えHVTとして存在できるILTVのgB遺伝子ORFの長さは623アミノ酸をコードするもの程度か、これよりも短かいであろうと予想された。

実施例5. 欠失クローンFW050を元にした改変とその組み換えHVTのワクチン効果

ILTVのgBタンパク質のアミノ末端側429アミノ酸とポリA由来の40アミノ酸とを融合したタンパク質を発現するであろう、実施例3でワクチン効果が確認された組み換えHVT FW050から、発現するタンパク質のポリA由来の40アミノ酸を欠失させたタンパク質を発現させるべく、ホモロジーベクターp45/46CMVILgBfを構築した。

具体的には、特開2004-000111号公報記載のpGIBacpAをEcoRIとKpnIとで切断して得られた303bp断片と、実施例1で構築したpGIPecIL

gB2をEcoRIとKpnIで切斷して得られた5854bp断片とをライゲーションして、pGIPecILgB3を構築した。このpGIPecILgB3をBglIIとSfiIとで切斷して得られた2245bp断片と、実施例1で構築したp45/46PecILgBをBglIIとSfiIとで切斷して得られた6759bp断片とをライゲーションしてp45/46PecILgB2を構築した。

次に、pGIPecILgB2をテンプレートとして、配列番号16のP-BglIIと配列番号23のF-RとでPCRを行って623bpの断片を得た。これをBglIIとKpnIとで切斷して得られた616bp断片と、p45/46PecILgB2をBglIIとKpnIとで切斷して得られた7057bp断片とをライゲーションして、p45/46PecILgBfを構築した。

このp45/46PecILgBfをXbaIで完全切斷した後、PstIで部分切斷して得られた7102bp断片と、実施例1で構築したpGICMV(-)をPstIとXbaIとで切斷して得られた589bp断片とをライゲーションすることによりホモロジーべクターp45/46CMVILgBfの構築を完了した。

このホモロジーべクターp45/46CMVILgBfを用いて、組み換えHVTであるFW063を構築し純化した。組み換えHVT FW063の挿入遺伝子部分がホモロジーべクターの塩基配列と同一であり、変異されていないことを確認した。

さらに、FW050より逆にクローニングして、ホモロジーべクターp45/46PecILgBdellacを、以下の手順で構築した。

このクローニング時に用いたPCRのテンプレートは、FW050をニワトリに接種し回収したウイルスDNAであり、プライマーは、配列番号16のP-BglIIと配列番号24の45/46F(K)の2つのプライマーにより増幅して得られた944bp断片をBglIIとSfiIとで切斷して得られた707bp断片と、p45/46PecILgBlacをBglIIとSfiIとで切斷して得られた10809bp断片とをライゲーションして、ホモロジーべクターp45/46PecILgBdellacを構築した。このホモロジーべクターp45/46PecILgBd

ellacを用いて、組み換えHVT FW069の純化構築に成功した。

上記FW050と同様に、ポリA部分は全く変えずに、gBタンパク質のアミノ末端側429アミノ酸のORFが終了した箇所にターミネーションを入れたホモロジーベクターp45/46PecILgBdellac+STPを、以下の手順で構築した。

まず配列番号16のプライマーP-BgIIIと配列番号25のプライマーgBde1STP-Rとを用いて増幅した637bp断片と、配列番号26のプライマー-gBde1STP-Fと配列番号27のプライマー45/46F(B)とを用いて増幅した673bp断片とをテンプレートとして、プライマーP-BgIIIとプライマー45/46F(B)とでPCRを行うことにより、1263bpの断片を得て、これをBgIIIとSfiIとで切断して得られた707bp断片と、p45/46PecILgBlacのBgIIIとSfiIとで切断して得られた10809bp断片とをライゲーションすることにより、ホモロジーベクターp45/46PecILgBdella c+STPを構築した。

このホモロジーベクターp45/46PecILgBdellac+STPを用いて、組み換えHVT FW070の純化構築に成功した。

このように、実施例3に示されたFW050と同じくgB遺伝子のORFが429アミノ酸であるFW063、FW069及びFW070は、問題なく純化できた。このことから、配列番号2記載のアミノ酸配列のアミノ末端側429アミノ酸をコードするgB遺伝子由来のDNAを、プロモータと共に組み込んだ組み換えHVTで発現しようとした場合、純化が可能であることがわかった。

こうして純化された組み換えHVTであるFW063、FW069、及び実施例3で純化されたFW050を用いて、実施例3と同様に、ニワトリに対するチャレンジ実験を行い、ワクチン効果を調べた。結果を表2に示す。

(表 2)

| | 組み換え HVT | ホモロジーベクター | 防御率 % (防御羽数 / 全羽数) × 100 |
|--------|-------------|---------------------|-----------------------------|
| コントロール | | | 0 (0/7) |
| チャレンジ | FW050 | p45/46PecILgBlac | 54 (7/13) |
| チャレンジ | FW063 | p45/46CMVILgBf | 33 (5/15) |
| チャレンジ | FW069 | p45/46PecILgBdellac | 56 (9/16) |

この結果から、付加配列のないFW063にもワクチン効果は認められ、付加配列のあるFW069及びFW050は、より優れたワクチン効果を示すことが判った。

請求の範囲

1. 伝染性喉頭気管炎ウイルスのgB遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ末端側のアミノ酸429個からなるポリペプチド、又はその1つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、又は置換されたポリペプチドをコードするDNAを有する組み換えヘルペスウイルス(但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く)。
2. 前記DNAの3'末端に、インフレームで配列番号4記載のアミノ酸配列、又は、その1つ或いは複数個のアミノ酸が欠失、付加、又は置換されたアミノ酸配列をコードするDNAが連結している請求項1記載の組み換えヘルペスウイルス(但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く)。
3. ヘルペスウイルスが鳥類に感染するウイルス(但し、伝染性喉頭気管炎ウイルスを除く)である請求項1又は2記載の組み換えヘルペスウイルス。
4. 鳥類に感染するヘルペスウイルスが、マレック病ウイルス1、2又は3型である請求項3記載の組み換えヘルペスウイルス。
5. 請求項1~4のいずれかに記載の組み換えヘルペスウイルスを有効成分とする抗伝染性喉頭気管炎ウイルス用ワクチン。

Fig.1

p45/46PecILgBlac

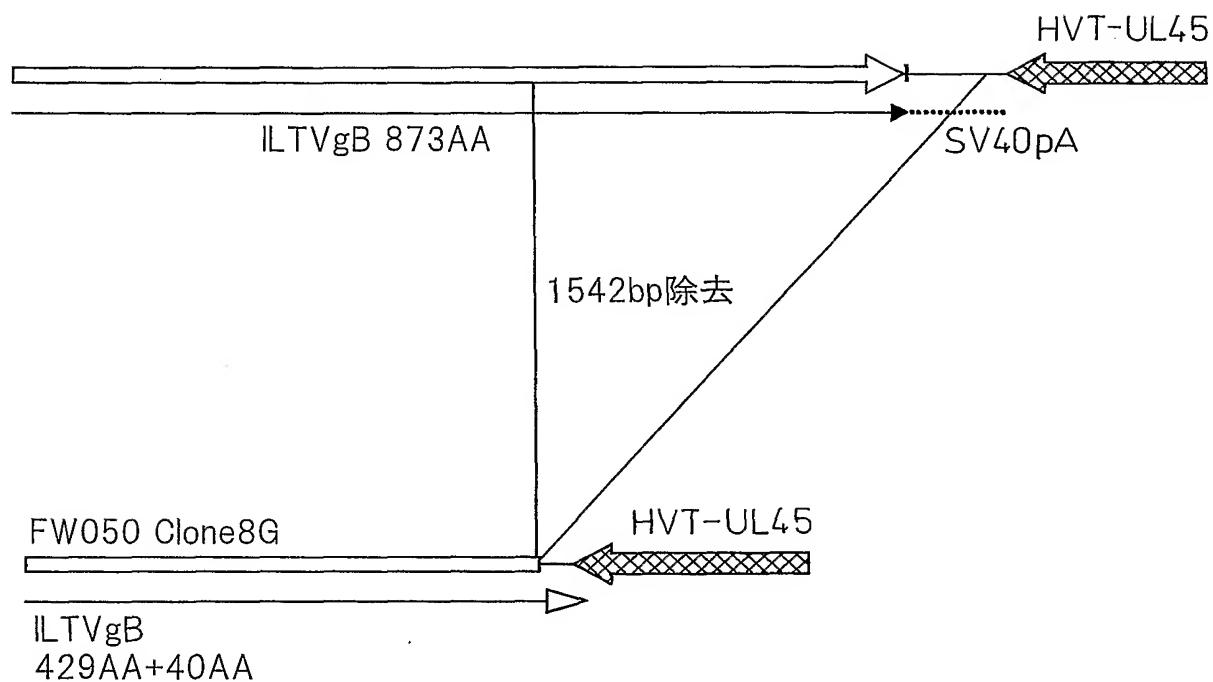
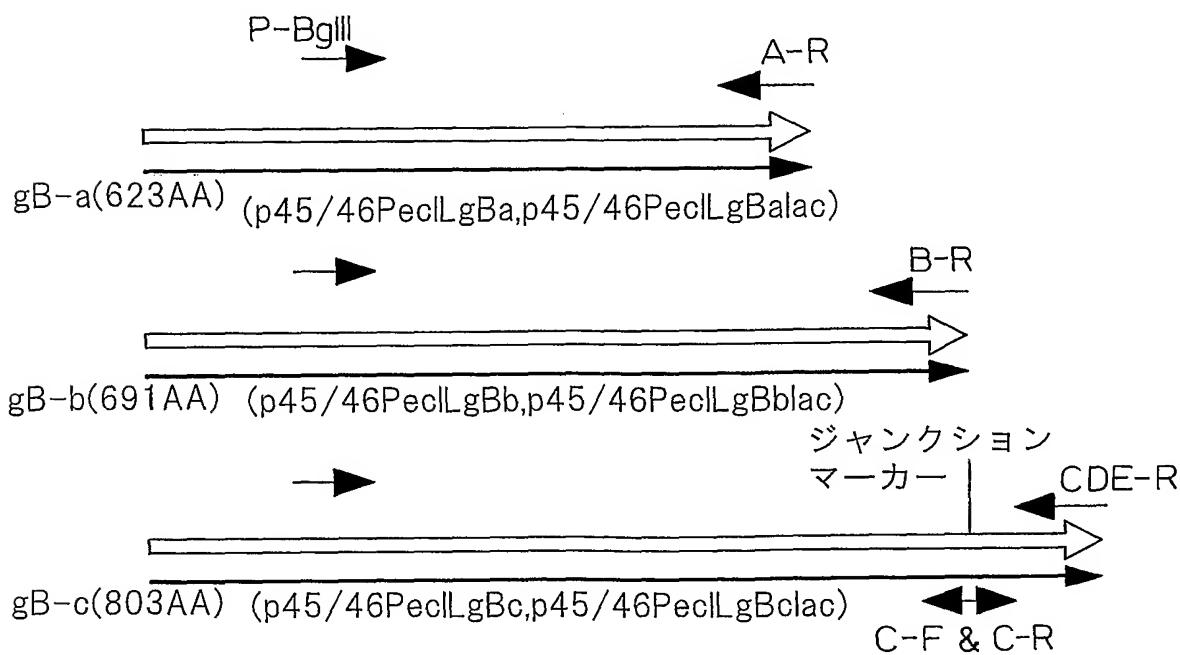
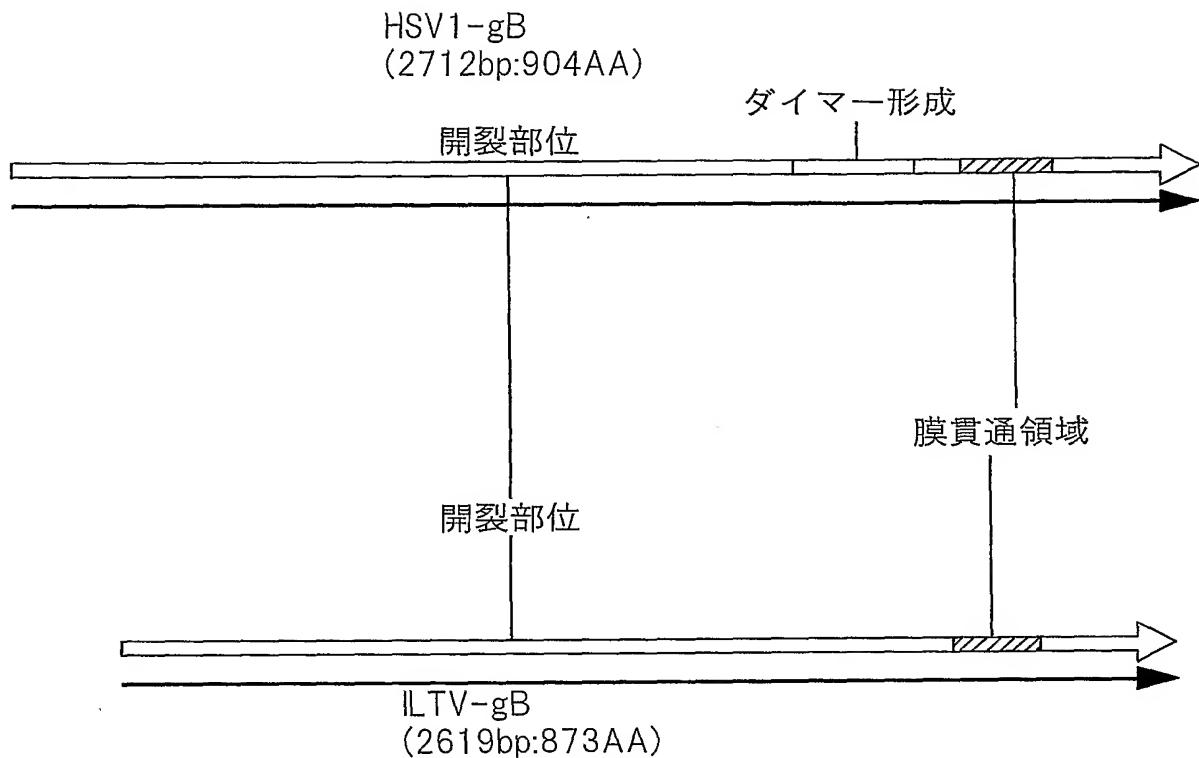


Fig.2



SEQUENCE LISTING

<110> Zeon Corp.

<120> Recombinant Herpes Virus and Use Thereof

<130> P852

<160> 27

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Infectious laryngotracheitis virus and artificial ORF

<400> 1

Met Ala Ser Leu Lys Met Leu Ile Cys Val Cys Val Ala Ile Leu Ile
1 5 10 15

Pro Ser Thr Leu Ser Gln Asp Ser His Gly Ile Ala Gly Ile Ile Asp
20 25 30

Pro Arg Asp Thr Ala Ser Met Asp Val Gly Lys Ile Ser Phe Ser Glu
35 40 45

Ala Ile Gly Ser Gly Ala Pro Lys Glu Pro Gln Ile Arg Asn Arg Ile
50 55 60

Phe Ala Cys Ser Ser Pro Thr Gly Ala Ser Val Ala Arg Leu Ala Gln
65 70 75 80

Pro Arg His Cys His Arg His Ala Asp Ser Thr Asn Met Thr Glu Gly
85 90 95

Ile Ala Val Val Phe Lys Gln Asn Ile Ala Pro Tyr Val Phe Asn Val
100 105 110

Thr Leu Tyr Tyr Lys His Ile Thr Thr Val Thr Thr Trp Ala Leu Phe
115 120 125

Ser Arg Pro Gln Ile Thr Asn Glu Tyr Val Thr Arg Val Pro Ile Asp
130 135 140

Tyr His Glu Ile Val Arg Ile Asp Arg Ser Gly Glu Cys Ser Ser Lys
145 150 155 160

Ala Thr Tyr His Lys Asn Phe Met Phe Phe Glu Ala Tyr Asp Asn Asp
165 170 175

Glu Arg Glu Lys Lys Leu Pro Leu Val Pro Ser Leu Leu Arg Ser Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 180 | 185 | 190 |
| Val Ser Lys Ala Phe His Thr Thr Asn Phe Thr Lys Arg His Gln Thr | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Leu Gly Tyr Arg Thr Ser Thr Ser Val Asp Cys Val Val Glu Tyr Leu | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Gln Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Tyr Phe Gly Met Ala Thr Gly | | |
| 225 | 230 | 235 |
| | | 240 |
| Asp Thr Val Glu Ile Ser Pro Phe Tyr Thr Lys Asn Thr Thr Gly Pro | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Arg Arg His Ser Val Tyr Arg Asp Tyr Arg Phe Leu Glu Ile Ala Asn | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Tyr Gln Val Arg Asp Leu Glu Thr Gly Gln Ile Arg Pro Pro Lys Lys | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Arg Asn Phe Leu Thr Asp Glu Gln Phe Thr Ile Gly Trp Asp Ala Met | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Glu Glu Lys Glu Ser Val Cys Thr Leu Ser Lys Trp Ile Glu Val Pro | | |
| 305 | 310 | 315 |
| | | 320 |
| Glu Ala Val Arg Val Ser Tyr Lys Asn Ser Tyr His Phe Ser Leu Lys | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Asp Met Thr Met Thr Phe Ser Ser Gly Lys Gln Pro Phe Asn Ile Ser | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Arg Leu His Leu Ala Glu Cys Val Pro Thr Ile Ala Ser Glu Ala Ile | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Asp Gly Ile Phe Ala Arg Lys Tyr Ser Ser Thr His Val Arg Ser Gly | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Asp Ile Glu Tyr Tyr Leu Gly Ser Gly Gly Phe Leu Ile Ala Phe Gln | | |
| 385 | 390 | 395 |
| | | 400 |
| Lys Leu Met Ser His Gly Leu Ala Glu Met Tyr Leu Glu Glu Ala Gln | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Arg Gln Asn His Leu Pro Arg Gly Arg Glu Arg Arg Gln Gly Asp Leu | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Tyr Lys Cys Gly Met Ala Asp Tyr Asp His Glu Gln Thr Val Arg Thr | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Glu Gly Pro Glu Met Ser Leu Gly Thr Val Asn Arg Pro Ile Arg Pro | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Ile Tyr Ser Ser His | | |

465

<210> 2

<211> 429

<212> PRT

<213> Infectious laryngotracheitis virus

<400> 2

Met Ala Ser Leu Lys Met Leu Ile Cys Val Cys Val Ala Ile Leu Ile

1 5 10 15

Pro Ser Thr Leu Ser Gln Asp Ser His Gly Ile Ala Gly Ile Ile Asp

20 25 30

Pro Arg Asp Thr Ala Ser Met Asp Val Gly Lys Ile Ser Phe Ser Glu

35 40 45

Ala Ile Gly Ser Gly Ala Pro Lys Glu Pro Gln Ile Arg Asn Arg Ile

50 55 60

Phe Ala Cys Ser Ser Pro Thr Gly Ala Ser Val Ala Arg Leu Ala Gln

65 70 75 80

Pro Arg His Cys His Arg His Ala Asp Ser Thr Asn Met Thr Glu Gly

85 90 95

Ile Ala Val Val Phe Lys Gln Asn Ile Ala Pro Tyr Val Phe Asn Val

100 105 110

Thr Leu Tyr Tyr Lys His Ile Thr Thr Val Thr Thr Trp Ala Leu Phe

115 120 125

Ser Arg Pro Gln Ile Thr Asn Glu Tyr Val Thr Arg Val Pro Ile Asp

130 135 140

Tyr His Glu Ile Val Arg Ile Asp Arg Ser Gly Glu Cys Ser Ser Lys

145 150 155 160

Ala Thr Tyr His Lys Asn Phe Met Phe Phe Glu Ala Tyr Asp Asn Asp

165 170 175

Glu Arg Glu Lys Lys Leu Pro Leu Val Pro Ser Leu Leu Arg Ser Thr

180 185 190

Val Ser Lys Ala Phe His Thr Thr Asn Phe Thr Lys Arg His Gln Thr

195 200 205

Leu Gly Tyr Arg Thr Ser Thr Ser Val Asp Cys Val Val Glu Tyr Leu

210 215 220

Gln Ala Arg Ser Val Tyr Pro Tyr Asp Tyr Phe Gly Met Ala Thr Gly

225 230 235 240

Asp Thr Val Glu Ile Ser Pro Phe Tyr Thr Lys Asn Thr Thr Gly Pro
 245 250 255
 Arg Arg His Ser Val Tyr Arg Asp Tyr Arg Phe Leu Glu Ile Ala Asn
 260 265 270
 Tyr Gln Val Arg Asp Leu Glu Thr Gly Gln Ile Arg Pro Pro Lys Lys
 275 280 285
 Arg Asn Phe Leu Thr Asp Glu Gln Phe Thr Ile Gly Trp Asp Ala Met
 290 295 300
 Glu Glu Lys Glu Ser Val Cys Thr Leu Ser Lys Trp Ile Glu Val Pro
 305 310 315 320
 Glu Ala Val Arg Val Ser Tyr Lys Asn Ser Tyr His Phe Ser Leu Lys
 325 330 335
 Asp Met Thr Met Thr Phe Ser Ser Gly Lys Gln Pro Phe Asn Ile Ser
 340 345 350
 Arg Leu His Leu Ala Glu Cys Val Pro Thr Ile Ala Ser Glu Ala Ile
 355 360 365
 Asp Gly Ile Phe Ala Arg Lys Tyr Ser Ser Thr His Val Arg Ser Gly
 370 375 380
 Asp Ile Glu Tyr Tyr Leu Gly Ser Gly Gly Phe Leu Ile Ala Phe Gln
 385 390 395 400
 Lys Leu Met Ser His Gly Leu Ala Glu Met Tyr Leu Glu Glu Ala Gln
 405 410 415
 Arg Gln Asn His Leu Pro Arg Gly Arg Glu Arg Arg Gln
 420 425
 <210> 3
 <211> 1287
 <212> DNA
 <213> Infectious laryngotracheitis virus
 <400> 3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| atggctagct | tgaaaatgct | gatctgcgtg | tgcgtggcaa | tcctgatccc | atctacccta | 60 |
| tctcaagatt | cacacggaat | tgccggaata | atagaccctc | gtgatacagc | cagcatggat | 120 |
| gttggaaaaa | tctttctc | cgaagccatt | gggtcgffff | caccgaaaga | accccgatt | 180 |
| agaaacagaa | ttttgcgtg | ctcatctcca | actggcgcca | gtgttgcgag | gcttgcccag | 240 |
| ccacgacatt | gtcaccgaca | tgccgattcg | actaacatga | ctgaaggaaat | tgccgtagtc | 300 |
| ttcaagcaaa | acattgcccc | gtacgtctt | aatgtgactc | tatactataa | acatataacc | 360 |
| acagttacta | cgtggcatt | attctcaaga | ccccaaataa | caaatgagta | cgtgaccagg | 420 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------|
| gttccaatag | actatcatga | aattgtcagg | attgatcgat | cgggagaatg | ctcatccaaa | 480 |
| gcaacgtatc | ataaaaattt | catgttttt | gaagcttacg | acaatgatga | acgagaaaaaa | 540 |
| aaattgcccc | tggttccatc | actgttaaga | tcaactgtct | ccaaggcggt | tcataacaact | 600 |
| aactttacta | agcgacatca | aaccctggga | taccgaacgt | ctacatcggt | cgactgtgtt | 660 |
| gtggaatatc | tacaggctag | atctgtatac | ccgtatgatt | actttggaat | ggcgacaggt | 720 |
| gatacagtag | aaatttctcc | cttttatacc | aaaaacacga | ccggaccaag | gcgtcacagt | 780 |
| gtctacagag | actatagatt | tctcgaaatc | gcaaattatc | aagtcaaggaa | tttggaaacc | 840 |
| ggacaaataa | gacccttaa | aaaaagaaac | tttctaacag | atgaacaatt | cactataggc | 900 |
| tgggatgcaa | tggaagaaaa | ggaatctgta | tgtactctca | gtaaatggat | tgaagtcccg | 960 |
| gaagcagttc | gtgtttcgta | caaaaacagt | taccacttt | cactaaaga | tatgactatg | 1020 |
| acgttcttgt | ccggaaaaca | accttttaac | atcagcaggc | ttcatttggc | tgaatgcgtt | 1080 |
| cctaccatag | cttcggaggc | catagatggc | atcttgcca | gaaagtatag | ttcgactcat | 1140 |
| gtccgttctg | gggacatcga | atactatctc | ggtagtggcg | gatttctgat | cgcatttcag | 1200 |
| aaactcatga | gccatggctt | ggctgaaatg | tacctagaag | aggcacaaag | acaaaatcat | 1260 |
| ctccccgagag | ggagagagcg | tcgccaa | | | | 1287 |

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> SV40 pA signal

<400> 4

Gly Asp Leu Tyr Lys Cys Gly Met Ala Asp Tyr Asp His Glu Gln Thr

1 5 10 15

Val Arg Thr Glu Gly Pro Glu Met Ser Leu Gly Thr Val Asn Arg Pro

20 25 30

Ile Arg Pro Ile Tyr Ser Ser His

35 40

<210> 5

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SV40 pA signal

<400> 5

ggcgacctct acaaatgtgg tatggctgat tatgatcatg aacagactgt gaggactgag 60

gggcctgaaa tgagccttgg gactgtaat cggccaataa ggcctattta ctcatcgcat 120
<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 6

tgtaaaacga cggccagt 18
<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 7

ttcggtaccg gttattatta ttttttgac 29
<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 8

gggctgcaga gttattaata gtaatcaatt 30
<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 9

gcactcggat ccattgacat ggctagc 27
<210> 10
<211> 30
<212> DNA

<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 10
agatgccatc tatggctcc gaagctatgg 30
<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 11
tggctgaatg cgttcctacc atagcttcgg 30
<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 12
cgggtagctt attcgtcttc gctttcttc 29
<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 13
gccaggcgcg ccatttacgg tcattgacgt 30
<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 14

acgtcaatga cggtaaatgg cgccgcctggc 30
<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 15
cgtctagagg atctgacggt tcactaaacc 30
<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 16
ggcttagatct gtatacccggt atgattactt 30
<210> 17
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 17
cggtacctta ttgtctaaca aatgtatagt 30
<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 18
cggtacctta atctccacgt attacagtgt 30
<210> 19
<211> 30
<212> DNA

<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 19
ttacatattt atctccacgt attacagtgt 30
<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 20
acgtggagat aaatatgtaa tgaacctgaa 30
<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 21
cggtacctta ttgcgtttcg ctttcttctg 30
<210> 22
<211> 1410
<212> DNA
<213> Recombinant herpes virus turkey
<400> 22
atggcttagct tgaaaatgct gatctgcgtg tgcgtggcaa tcctgatccc atctacccta 60
tctcaagatt cacacggaat tgccggaata atagaccctc gtgatacagc cagcatggat 120
gttggaaaaaa tctctttctc cgaagccatt gggtcggggg caccgaaaga accccagatt 180
agaaaacagaaa ttttgcgtg ctcatctcca actggcgcca gtgttgcgag gcttgcgcag 240
ccacgacatt gtcaccgaca tgccgattcg actaacatga ctgaaggaaat tgccgtagtc 300
ttcaagcaaa acattgcccc gtacgtctt aatgtgactc tatactataa acatataacc 360
acagttacta cgtggcatt attctcaaga ccccaaataa caaatgagta cgtgaccagg 420
gttccaatag actatcatga aattgtcagg attgatcgat cgggagaatg ctcatccaaa 480
gcaacgtatc ataaaaattt catgttttt gaagcttacg acaatgatga acgagaaaaaa 540
aaattgcccc tggttccatc actgttaaga tcaactgtct ccaaggcggt tcataacaact 600

| | |
|--|------|
| aactttacta agcgacatca aaccctggga taccgaacgt ctacatcggt cgactgtgtt | 660 |
| gtggaatatc tacaggctag atctgtatac ccgtatgatt actttggaaat ggcgacaggt | 720 |
| gatacagtag aaatttctcc ctttatacc aaaaacacga ccggaccaag gcgtcacagt | 780 |
| gtctacagag actatagatt tctcgaaatc gcaaattatc aagtcaggaa tttggaaacc | 840 |
| ggacaataa gaccccctaa aaaaagaaac tttctaacag atgaacaatt cactataggc | 900 |
| tgggatgcaa tggaagaaaa ggaatctgta tgtactctca gtaaatggat tgaagtcccg | 960 |
| gaagcagttc gtgttcgta caaaaacagt taccacttt cacttaaaga tatgactatg | 1020 |
| acgttctcggt ccggaaaaca accttttaac atcagcaggc ttcatggc tgaatgcgtt | 1080 |
| cctaccatag cttcgaggc catagatggc atcttgcca gaaagtatag ttgcactcat | 1140 |
| gtccgttctg gggacatcga atactatctc ggtagtggcg gatttctgat cgcatattcag | 1200 |
| aaactcatga gccatggctt ggctgaaatg tacctagaag aggacaaaag acaaaaatcat | 1260 |
| ctcccgagag ggagagagcg tcgccaaggc gacctctaca aatgtggtat ggctgattat | 1320 |
| gatcatgaac agactgttag gactgagggg cctgaaatga gccttggac tgtgaatcgg | 1380 |
| ccaataaggc ctatTTTactc atcgcatTTAG | 1410 |
| | |
| <210> 23 | |
| <211> 30 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| <220> | |
| <223> Synthetic | |
| <400> 23 | |
| | |
| cggtacctta ttggcgacgc tctctccctc | 30 |
| <210> 24 | |
| <211> 24 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| <220> | |
| <223> Synthetic | |
| <400> 24 | |
| | |
| ggggaaagtct tccggtaag ggac | 24 |
| <210> 25 | |
| <211> 30 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| <220> | |
| <223> Synthetic | |

<400> 25
cataccacat ttgttagaggt cctattggcg 30
<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 26
cgagagggag agagcgtcgc caataggacc 30
<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Synthetic
<400> 27
tagcggcacg gaaacagata gaga 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/004585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/38, C12N15/869, A61K39/255, 39/265,
C12N7/01// (C12N7/01, C12R1:93)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/38, C12N15/869, A61K39/255, 39/265,
C12N7/01// (C12N7/01, C12R1:93)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2005 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2005 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2005 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X Y | JP 2001-000188 A (Nippon Zeon Co., Ltd.), 09 January, 2001 (09.01.01), & US 4935938 A & EP 316664 A | <u>1, 3-4</u> 2 |
| X Y | US 5443831 A (Keeler C.L.), 22 August, 1995 (22.08.95), (Family: none) | <u>1, 3-4</u> 2 |
| Y | JP 11-192093 A (Nippon Zeon Co., Ltd.), 21 July, 1999 (21.07.99), & US 6632664 B1 & EP 1026246 A1 | 2 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" document member of the same patent family |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
13 May, 2005 (13.05.05)

Date of mailing of the international search report
31 May, 2005 (31.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ C12N15/38, C12N15/869, A61K39/255, 39/265, C12N7/01 // (C12N7/01, C12R1:93)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ C12N15/38, C12N15/869, A61K39/255, 39/265, C12N7/01 // (C12N7/01, C12R1:93)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2005年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2005年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2005年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
SwissProt/PIR/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | JP 2001-000188 A (日本ゼオン株式会社) 2001.01.09 | <u>1, 3-4</u> |
| Y | & US 4935938 A & EP 316664 A | 2 |
| X | US 5443831 A (Keeler C. L.) 1995.08.22 | <u>1, 3-4</u> |
| Y | (ファミリーなし) | 2 |
| Y | JP 11-192093 A (日本ゼオン株式会社) 1999.07.21 & US 6632664 B1 & EP 1026246 A1 | 2 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.05.2005

国際調査報告の発送日

31.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

高堀 栄二

4B

3540

電話番号 03-3581-1101 内線 3448